

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



PCT/JP 99/04521

23.08.99

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 08 OCT 1999

WIPO PCT

JP99/4521

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1998年 8月24日

出願番号  
Application Number:

平成10年特許願第237108号

出願人  
Applicant(s):

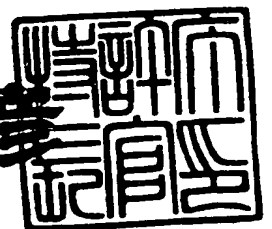
黒川 清  
宮田 敏男

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 9月24日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-306405

【書類名】 特許願

【整理番号】 F2-001

【提出日】 平成10年 8月24日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61M 1/28

【発明の名称】 腹膜透析液

【請求項の数】 10

【発明者】

    【住所又は居所】 神奈川県小田原市城山 3 - 3 - 1

    【氏名】 宮田 敏男

【特許出願人】

    【識別番号】 597142387

    【氏名又は名称】 黒川 清

【特許出願人】

    【識別番号】 597142376

    【氏名又は名称】 宮田 敏男

【代理人】

    【識別番号】 100102978

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

    【識別番号】 100108774

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 041092

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 腹膜透析液

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 カルボニル化合物トラップ剤を含む腹膜透析液。

【請求項 2】 第 1 室および第 2 室からなる分画された容器に収容された腹膜透析液において、第 1 室に還元糖が収容され、第 2 室にカルボニル化合物トラップ剤が収容されているものである、請求項 1 記載の腹膜透析液。

【請求項 3】 腹膜透析回路内にカルボニル化合物トラップ剤を注入するものである、請求項 1 記載の腹膜透析液。

【請求項 4】 腹腔内にカルボニル化合物トラップ剤を投与するものである、請求項 1 記載の腹膜透析液。

【請求項 5】 カルボニル化合物トラップ剤がアミノグアニジン、ピリドキサミンまたは S H 基含有化合物、あるいはそれらの誘導体である、請求項 1 乃至 4 記載の腹膜透析液。

【請求項 6】 カルボニル化合物トラップ剤がメイラード反応阻害剤である、請求項 1 乃至 4 記載の腹膜透析液。

【請求項 7】 カルボニル化合物トラップ剤を有効成分とする腹膜透析における腹腔内のカルボニルストレス状態改善剤。

【請求項 8】 カルボニル化合物トラップ剤を有効成分とする腹膜透析液に混入させるためのカルボニルストレス状態改善剤。

【請求項 9】 カルボニル化合物トラップ剤がアミノグアニジン、ピリドキサミンまたは S H 基含有化合物、あるいはそれらの誘導体である、請求項 7 または 8 に記載のカルボニルストレス状態改善剤。

【請求項 10】 カルボニル化合物トラップ剤がメイラード反応阻害剤である、請求項 7 または 8 に記載のカルボニルストレス状態改善剤。

【発明の詳細な説明】

【発明の属する技術分野】

本発明は、腎不全患者の治療に用いられる腹膜透析液に関する。

【0001】

## 【従来の技術】

慢性腎不全患者に行われる透析には、血液透析と腹膜透析とがある。腹膜透析とは、腹腔内に透析液を一定時間蓄留させ、体内の老廃物を腹膜を通して透析液中へ排泄させた後、透析液を回収することにより行われる透析であり、間欠的腹膜透析法（IPD）と持続的外来腹膜透析法（CAPD: continuous ambulatory peritoneal dialysis）に大別される。

CAPD法は、IPD法の長所を取り入れ、腹腔内に注入する灌流液の貯留時間を長くして、1日4回程度の液交換とする腹膜透析法である。

## 【0002】

腹膜透析は簡便で時間的な拘束が少ないなどの長所を持つが、腹膜透析を長期間続けていると次第に除水能が低下し、腹部のタンパク質の変性や硬化、腹膜融合などが起きることが知られている。

## 【0003】

これらの原因の一部は、腹膜透析液に含まれるグルコースにあると考えられる。現在、使用されている腹膜透析液の多くは、浸透圧剤としてグルコースを含有する。グルコースは熱に対して不安定で、滅菌時に一部が分解し、タンパク質を修飾し得る反応性の高いカルボニル化合物が分解産物として生成すると考えられる。また、グルコースを含む腹膜透析液は、滅菌後、保存中にも分解産物が生成・蓄積すると考えられる。

## 【0004】

高濃度のグルコースの入った腹膜透析液は、タンパク質を修飾するなど、腹膜にとって好ましくないとの観点から、より分解しにくいグルコースポリマーを用いた腹膜透析液が開発されている（特開平10-94598号、Wilkie, M.E. et al., Perit. Dial. Int., 17: S47-50 (1997)）。

さらに同様の視点から浸透圧物質としてグルコースに代えてシクロデキストリン（特開平8-71146号）、二糖類（特開平8-131541号）、アミノ酸（Faller, B. et al., Kidney Int., 50(suppl.56), S81-85 (1996)）を使用した腹膜透析液も提案されている。また、システインを添加してグルコースの分解を抑制した腹膜透析液も開示されている（特開平5-105633号）。

これらの方法はいずれも、腹膜透析液中の高濃度グルコースを対象としたものである。

【0005】

また、慢性腎不全の患者において、高血糖の有無に関わらず血中や組織中に反応性の高いカルボニル化合物やAGE (Advanced glycation end products) が著しく蓄積している (Miyata, T. et al., *Kidney Int.*, 51: 1170-1181 (1997)、Miyata, T. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 7: 1198-1206 (1996)、Miyata, T. et al., *Kidney Int.*(in press)、Miyata, T. et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*(in press))。これは腎不全においては、非酵素的生化学反応によりカルボニル化合物が高負荷の状態 (カルボニストレス) となり、タンパク質修飾が亢進される病態が存在しており、糖・脂質からカルボニル化合物が生成されタンパク質を修飾するためであると考えられる。

【0006】

腹膜透析の場合、血中の老廃物は腹膜を通して腹膜透析液中に排泄される。高浸透圧の腹膜透析液は、腎不全患者の血中に蓄積した反応性の高いカルボニル化合物を、腹膜を介して腹腔内の腹膜透析液中に集める作用があるため、腹膜透析液中のカルボニル化合物濃度の高いカルボニストレスの状態が続くと、腹腔内のタンパク質がカルボニル修飾を受け、腹膜の機能が低下し、腹膜硬化症の進展に関与すると考えられる。

実際に、腹膜透析患者において、腹腔内が導入されたグルコースによってカルボニストレス状態となっていることは、内皮および中皮の免疫組織学的検討から証明された (Yamada, K. et al., *Clin. Nephrol.*, 42: 354-361 (1994)、Nakayama, M. et al., *Kidney Int.*, 51: 182-186 (1997))。

【0007】

一方、前述のグルコースの分解は、中性付近から塩基性側で生じ易いことから、通常の腹膜透析液では、グルコースの安定性を考慮して、酸性側 (pH 5.0~5.4) のpHを与える緩衝系が用いられることが多い。ところが、このような酸性の腹膜透析液は、腹腔マクロファージの免疫防御機構の低下や細菌の進入による腹膜炎の発生、腹膜中皮細胞への傷害性などが危惧される。しかし、腹膜透析液の



pHを生理的な中性付近に設定すると、グルコースの分解が促進されるというジレンマがあった。そこで、グルコースの分解に由来するカルボニル化合物の発生を抑制しつつ、生理的にマイルドなpH域を有する腹膜透析液が切望されていた。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、腹膜透析におけるカルボニル化合物による障害の影響を防止することができる腹膜透析液の提供を課題としている。また、本発明は、腹膜透析施行中のカルボニルストレス状態を改善するための薬剤の提供を課題としている。本発明におけるカルボニル化合物とは、腹膜透析を受ける患者に由来するカルボニル化合物、腹膜透析液自体がその製造中あるいは保存中に生成したカルボニル化合物、並びに腹膜透析中に生成されるカルボニル化合物が対象となる。これらのカルボニル化合物による透析患者に対する障害を、できるだけ小さくすることが本発明の課題である。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、患者の腹腔内に注入された腹膜透析液中に含まれる反応性の高いカルボニル化合物は、もともとの腹膜透析液に由来するものだけではないという知見を得た。即ち、腹膜透析患者から回収された腹膜透析排液中のグルコース以外のカルボニル化合物は、透析前の5倍となり、増加分は血液由来のカルボニル化合物と考えられた（図1）。このことから、腹腔内の腹膜透析液中のカルボニル化合物は、腹膜透析液の加熱滅菌の過程で生じるカルボニル化合物および加熱滅菌した腹膜透析液の保存中に生成・蓄積するカルボニル化合物に加え、血液由来のカルボニル化合物および腹腔内の酸化ストレスにより生成・蓄積するカルボニル化合物があり、これらのうち血液由来のカルボニル化合物および腹腔内の酸化ストレスにより生成・蓄積するカルボニル化合物の除去については、従来のように腹膜透析液中のカルボニル化合物を除去するだけでは不十分であるという知見を得た。実際、免疫染色法を用いた腹膜透析患者の腹膜組織の検査においても、カルボニル修飾蛋白が組織内に局在していた（図2）。

【0010】

本発明者らは、腎不全においては生体内タンパク質修飾を亢進する病態が存在しており、腹膜透析のように腹腔内に持続的に高濃度のグルコースを注入する場合、腹腔内のカルボニル化合物が蓄積した腹膜透析液によって、腹腔タンパク質は一層、非酵素的に修飾を受け易いことに想到した（図3）。また、カルボニルストレスは、単にコラーゲンやフィブロネクチンなどのマトリックスタンパク質の構築を変化させるという問題に止まらず、カルボニル化合物は各種細胞に対し生理活性を有しているので、腹膜透過性の亢進・炎症の惹起、さらには腹膜硬化症の進展に関係すると考えられる。このようなことから、本発明者らは、血中に蓄積するカルボニル化合物をより重視し、カルボニルストレスによるタンパク質修飾を中心とした腹膜透析合併症を阻害するような透析液が有用であり、前記課題の達成のためにカルボニル化合物との化学的な反応や吸着によってカルボニル化合物の透析患者に対する障害活性を失わせる、または低下させる化合物（カルボニル化合物トラップ剤）の利用が有効であることを見出し本発明を完成した。

## 【0011】

すなわち本発明は、カルボニル化合物トラップ剤を用いた腹膜透析液に関し、より具体的には、

- (1) カルボニル化合物トラップ剤を含む腹膜透析液、
- (2) 第1室および第2室からなる分画された容器に収容された腹膜透析液において、第1室に還元糖が収容され、第2室にカルボニル化合物トラップ剤が収容されているものである、(1)に記載の腹膜透析液、
- (3) 腹膜透析回路内にカルボニル化合物トラップ剤を注入するものである、(1)に記載の腹膜透析液、
- (4) 腹腔内にカルボニル化合物トラップ剤を投与するものである、(1)に記載の腹膜透析液、
- (5) カルボニル化合物トラップ剤がアミノグアニジン、ピリドキサミンまたはSH基含有化合物、あるいはそれらの誘導体である、(1)乃至(4)に記載の腹膜透析液、
- (6) カルボニル化合物トラップ剤がメイラード反応阻害剤である、(1)乃至(4)に記載の腹膜透析液、

(7) カルボニル化合物トラップ剤を有効成分とする腹膜透析における腹腔内のカルボニルストレス状態改善剤、

(8) カルボニル化合物トラップ剤を有効成分とする腹膜透析液に混入させるためのカルボニルストレス状態改善剤、

(9) カルボニル化合物トラップ剤がアミノグアニジン、ピリドキサミンまたはSH基含有化合物、あるいはそれらの誘導体である、(7)または(8)に記載のカルボニルストレス状態改善剤、および

(10) カルボニル化合物トラップ剤がメイラード反応阻害剤である、(7)または(8)に記載のカルボニルストレス状態改善剤、に関する。

#### 【0012】

本発明において、トラップの対象となるカルボニル化合物とは、例えば腎不全患者の血中に酸化ストレスにともなって蓄積する以下のような化合物が含まれる。

炭水化物に由来するカルボニル化合物：

- ・アラビノース、
- ・グリオキサール、
- ・メチルグリオキサール、

アスコルビン酸に由来するカルボニル化合物：

- ・デヒドロアスコルビン酸

脂質に由来するカルボニル化合物：

- ・ヒドロキシノネナール
- ・マロンジアルデヒド
- ・アクロレイン

また、非酸化的に生成される3-デオキシグルコゾン等もトラップの対象となる。

#### 【0013】

本発明では、患者の組織・血液中や腹腔中で生成するカルボニル化合物のみならず、腹膜透析液の製造過程、ならびに保存中に生成するカルボニル化合物のト

ラップをも達成する。先に述べたとおり、浸透圧調節剤としてグルコースを高濃度で含む腹膜透析液には、常にカルボニル化合物生成の可能性が伴う。この種のカルボニル化合物としては、たとえば以下のような物質が知られている(Richard, J. U. et al., Fund. Appl. Toxic., 4: 843-853 (1984))。

- ・ 3-デオキシグルコゾン
- ・ 5-ヒドロキシメチルフルフラール (5-hydroxymethylfurfural、以下5-HMFと省略する)
- ・ ホルムアルデヒド
- ・ アセトアルデヒド
- ・ グリオキサール
- ・ メチルグリオキサール
- ・ レブリン酸
- ・ フルフラール
- ・ アラビノース

#### 【0014】

浸透圧調節剤として用いる炭水化物には、グルコースよりも安定性に優れたものも報告されているが、加熱滅菌や保存中にこれらのカルボニル化合物の生成を完全に抑制することは容易ではない。したがって、グルコース以外の炭水化物を用いる場合であっても、カルボニル化合物トラップ剤の添加には意味がある。グルコース以外に腹膜透析の浸透圧調節剤として用いることが可能な炭水化物には、トレハロース(特開平7-323084)、加水分解でんぷん(特開平8-85701)、マルチトールやラクチトール(特開平8-131541)、あるいは非還元性オリゴ糖や非還元性多糖(特開平10-94598)等が知られている。

#### 【0015】

本発明におけるカルボニル化合物トラップ剤としては、カルボニル化合物との化学的な反応や吸着によってカルボニル化合物の透析患者に対する障害活性を失わせる化合物、あるいは低下させる化合物であって、その化合物そのものは透析患者に対して安全である物質を用いる。このような化合物には、例えば以下のよ

うなものが知られている。

・アミノグアニジン (Foote, E. F. et al., Am. J. Kidney Dis., 25: 420-425 (1995))

・ $\pm 2$ -イソプロピリデネヒドラゾノ-4-オクソ-チアゾリジン-5-イルアセタニリド ( $\pm 2$ -isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide: OPB-9195) (S.Nakamura, 1997, Diabetes. 46: 895-899)

【0016】

さらにカルボニル化合物トラップ剤としては、例えば以下のような化合物を用いることができる。

(1) メチルグアニジンなどのグアニジン誘導体 (特開昭 62-142114 号、特開昭 62-249908 号、特開平 1-56614 号、特開平 1-83059 号、特開平 2-156 号、特開平 2-765 号、特開平 2-42053 号、特開平 6-9380 号、特表平 5-505189 号)。

(2) ピラゾロン (特開平 6-287179 号)、ピラゾリン (特開平 10-167965 号)、ピラゾール (特開平 6-192089 号、特開平 6-298737 号、特開平 6-298738 号)、イミダゾリジン (特開平 5-201993 号、特開平 6-135968 号、特開平 7-133264 号、特開平 10-182460 号)、ヒダントイン (特開平 6-135968 号) などの 2 個の窒素原子を有する 5 員複素環式化合物。

(3) トリアゾール (特開平 6-192089 号) などの 3 個の窒素原子を有する 5 員複素環式化合物。

(4) チアゾリン (特開平 10-167965 号)、チアゾール (特開平 4-9375 号、特開平 9-59258 号)、チアゾリジン (特開平 5-201993 号、特開平 3-261772 号、特開平 7-133264 号、特開平 8-157473 号) などの 1 個の窒素原子と 1 個の硫黄原子を有する 5 員複素環式化合物。

(5) オキサゾール (特開平 9-59258 号) などの 1 個の窒素原子と 1 個の酸素原子を有する 5 員複素環式化合物。

(6) ピリジン (特開平 10-158244 号、特開平 10-175954 号)

、ピリミジン（特表平7-500811号）などの含窒素6員複素環式化合物。

(7)インダゾール（特開平6-287180号）、ベンゾイミダゾール（特開平6-305964号）、キノリン（特開平3-161441号）などの含窒素縮合複素環式化合物。

(8)ベンゾチアゾール（特開平6-305964号）などの含硫含窒素縮合複素環式化合物。

(9)ベンゾチオフエン（特開平7-196498号）などの含硫縮合複素環式化合物。

(10)ベンゾピラン（特開平3-204874号、特開平4-308586号）などの含酸素縮合複素環式化合物。

(11)カルバゾイル（特開平2-156号、特開平2-753号）、カルバジン酸（特開平2-167264号）、ヒドラジン（特開平3-148220号）などの窒素化合物。

(12)ベンゾキノン（特開平9-315960号）、ヒドロキノン（特開平5-9114号）などのキノン類。

(13)脂肪族ジカルボン酸（特開平1-56614号、特開平5-310565号）。

(14)ケイ素含有化合物（特開昭62-249709号）。

(15)有機ゲルマニウム化合物（特開平2-62885号、特開平5-255130号、特開平7-247296号、特開平8-59485号）。

(16)フラボノイド類（特開平3-240725号、特開平7-206838号、特開平9-241165号、WO94/04520）。

(17)アルキルアミン類（特開平6-206818号、特開平9-59233号、特開平9-40626号、特開平9-124471号）。

(18)アミノ酸類（特表平4-502611号、特表平7-503713号）。

(19)アスコクロリン（特開平6-305959号）、安息香酸（WO91/11997）、ピロロナフチリジニウム（特開平10-158265号）などの芳香族化合物。

(20)ポリペプチド（特表平7-500580号）。

- (21)ピリドキサミンなどのビタミン類 (WO 97/09981)。
- (22)グルタチオンなどのSH基含有化合物。
- (23)テトラサイクリン系化合物 (特開平6-256280号)。
- (24)キトサン類 (特開平9-221427号)。
- (25)タンニン類 (特開平9-40519号)。
- (26)第4級アンモニウムイオン含有化合物。

【0017】

以上のような化合物は、一般にメイラード反応阻害剤として知られている。メイラード反応とは、グルコースなどの還元糖とアミノ酸やタンパク質との間に生じる非酵素的な糖化反応であり、1912年にメイラード (Maillard) がアミノ酸と還元糖の混合物を加熱すると褐色に着色する現象に注目して報告した (Maillard, L. C., Compt. Rend. Soc. Biol., 72: 599 (1912))。このメイラード反応は、食品の加熱処理や貯蔵の間に生じる褐変化、芳香成分の生成、呈味、タンパク質変性などに関与していることから、食品化学の分野で研究が進められてきた。

【0018】

ところが、1968年ヘモグロビンの微小画分であるグリコシルヘモグロビン (Hb A1c) が生体内で同定され、さらにこれが糖尿病患者において増加することが判明し (Rahbar, S., Clin. Chim. Acta, 22: 296(1968))、それを契機に生体内におけるメイラード反応の意義並びに糖尿病合併症、動脈硬化などの成人病の発症や老化の進行との関係が注目されるようになってきた。そして、このような生体内のメイラード反応を阻害する物質の探索が精力的に行われ、前述の化合物類がメイラード反応阻害剤として見いだされた。

【0019】

しかし、このようなメイラード反応阻害剤が、腹膜透析液や血中由来のカルボニル化合物を排除して腹膜透析患者のカルボニルストレス状態を改善し、カルボニルストレスに起因する腹膜透析合併症を阻害することができるということは、全く知られていなかった。

【0020】

【発明の実施の形態】

本発明におけるカルボニル化合物のトラップ剤を添加するベースとなる腹膜透析液の組成は、公知のものとすればよい。一般的な腹膜透析液は、浸透圧調節剤、緩衝剤、および無機塩類などで構成されている。浸透圧調節剤には先に列挙したような糖類が用いられる。緩衝剤としては、主としてグルコースの安定性を考慮して酸性側 (pH5.0-5.4) のpHを与える緩衝系が用いられることが多い。もちろん、浸透圧調節剤にグルコースを加えないものでは、より生理的なpHである7.0前後のpHを与える緩衝剤が利用できる。また、グルコースを用いながら中性域のpHを利用できるように、使用時にpHを調節するための緩衝系を別に包装する商品形態も考案されている。なお、本発明では、加熱滅菌や長期保存時のグルコースの分解に由来するカルボニル化合物が除去されるため、従来グルコースの分解のために製剤学的に調製が困難であった中性域のpHを与える緩衝系を好適に用いることができる。更に腹膜透析液には、通常、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、あるいは塩化マグネシウムのような無機塩類が添加される。これらの塩類は、腹膜透析を生理的な条件に近づけ、生体適合性の向上を期待して添加されるものである。

#### 【0021】

本発明のカルボニル化合物トラップ剤は、このような公知の処方に対して、腹膜透析液の配合時に添加し、そのまま密封して加熱滅菌することができる。そうすることによって、加熱滅菌処理に伴う、これら主成分からのカルボニル化合物の生成に対して予防的な作用を期待できる。また、第1室および第2室からなる分画された容器に腹膜透析液を収容し、第1室に還元糖を収容し、第2室にカルボニル化合物トラップ剤を収容し、使用直前に混合してもよい。この場合、滅菌時および保存時に生成したカルボニル化合物は、混合されたトラップ剤と速やかに結合する。そして、腹腔内に投与された後、余剰のカルボニル化合物トラップ剤が血中由来のカルボニル化合物を捕捉する。

#### 【0022】

あるいは、適当な混注用コネクターを装備した腹膜透析回路に、カルボニル化合物トラップ剤を注入することもできる。この場合は、滅菌時および保存時に生成したカルボニル化合物は、回路中で捕捉される。



さらに、カルボニル化合物トラップ剤を直接腹腔内に投与して、腹腔内で腹膜透析液と混合することもできる。このとき腹膜透析液由来および血中由来のカルボニル化合物は、腹腔内で取り除かれる。

また、腹膜透析液を患者へ注入する前または腹腔内貯留中に、カルボニル化合物トラップ剤を静脈注射等によって腹膜透析患者体内へ投与することによって、腹腔内のカルボニルストレス状態の改善を図ることもできる。

さらにまた、腹膜透析液を小型の循環ポンプを使用して閉鎖系回路内で循環させるような腹膜透析法の場合にあっては、回路中のいずれかの箇所にカルボニル化合物トラップ剤を充填した濾過器を装置すればよい。

#### 【0023】

なお、本発明のカルボニル化合物トラップ剤は、単独で用いるほか、2種類以上の配合剤として使用してもよい。また、適当な担体に結合されていてもよい。

#### 【0024】

また、本発明のカルボニル化合物トラップ剤には、前述のメイラード反応阻害剤に代表される有機化合物の他、イオン交換樹脂などの高分子化合物、あるいは活性炭やシリカゲル、アルミナ、炭酸カルシウムなどの無機化合物も使用できる。これらの化合物は、クロマトグラフィーの充填剤として知られているものであるが、その吸着能を利用してカルボニル化合物をトラップすることができる。このような化合物は、腹膜透析回路に装置された濾過器内に充填して使用することができる。

#### 【0025】

以下に本発明による腹膜透析液の望ましい実施態様を具体的に示す。

まずベースとなる透析液の組成は、一般的には次のような処方を利用される。これらの処方はいくまでも一般的なものであり、実際には患者の症状に合わせてより適切な組成が採用される。

グルコース	1-5%w/v
ナトリウムイオン	100-150meq
カリウムイオン	0-0.05meq
マグネシウムイオン	0-2meq

カルシウムイオン	0-4meq
塩素イオン	80-150meq
緩衝剤	10-50mM

(乳酸、クエン酸、リンゴ酸、酢酸、ピルビン酸、コハク酸等の有機酸)

以上のような基本処方に対して、本発明によるカルボニル化合物のトラップ剤の有効量を添加する。たとえばアミノグアニジンを添加する場合には、1mM以上、好ましくは10mM以上、より好ましくは10mM以上100mM以下の濃度となるように添加する。添加量が少ない場合には、製造ならびに保存中に発生するカルボニル化合物にトラップ剤が消費されてしまい、実際の透析時に患者の血液や組織から透析液に浸出するカルボニル化合物を処理することができなくなるケースが予想される。特に患者の血液や組織から浸出するカルボニル化合物の量をあらかじめ予測することは困難なので、患者に対する安全性を保障できる範囲内でできるだけ多量のトラップ剤が活性を維持できるようにするのが効果的である。アミノグアニジンは、動物に対し低毒性であることが知られている。「化学物質の毒性効果表(Registry of Toxic Effect of Chemical Substances)」(1978)によれば、アミノグアニジンの半致死量は、ラット皮下注射の場合1258mg/kgであり、マウスでは963mg/kgである。また、水溶性にも優れている。この他OPB-9195の場合も同様に、1mM以上、好ましくは10mM以上、より好ましくは10mM以上100mM以下の濃度となるように添加する。

#### 【0026】

上記のような処方で配合された本発明による腹膜透析液は、適当な密閉容器に充填し、滅菌処理する。滅菌処理には高圧蒸気滅菌や熱水滅菌などの加熱滅菌が有効である。この場合、高温で有害物質を溶出せず、滅菌後も輸送に耐える強度を備えた容器を用いる。具体的にはポリ塩化ビニルやポリプロピレン、ポリエチレン、ポリエステル、エチレン酢酸ビニル共重合体などからなる可撓性プラスチックバッグが挙げられる。また、外気の影響による液の劣化を避けるために、腹膜透析液を充填した容器をさらにガスバリアー性の高い包装材で包装してもよい。

#### 【0027】

加熱滅菌に代えて、濾過滅菌を施すこともできる。例えば、孔径  $0.2\mu\text{m}$  程度のメンブランフィルターを備えた精密濾過器を用いて濾過することにより滅菌する。この場合は、加熱に由来するカルボニル化合物の生成を防止することができる。濾過滅菌された腹膜透析液は、可撓性プラスチックバッグなどの容器に充填された後、密封される。滅菌から輸送にいたる一連の処理は、現行の透析液の製造と何ら変わるところは無いので、同様の工程で本発明による腹膜透析液を製造することができる。

## 【0028】

高圧加熱滅菌を含む加熱滅菌により滅菌処理を行う場合、用いられるカルボニル化合物トラップ剤が加熱などの処理に対して十分安定であるならば、腹膜透析液配合時に該トラップ剤を予め添加してから、加熱滅菌操作を行うことができる。このようにすれば、加熱時の透析液由来のカルボニル化合物の生成・蓄積を抑制することができる。勿論、保存時や腹膜透析中にも該トラップ剤が機能し、カルボニルの生成・蓄積を抑えることができる。

## 【0029】

用いるカルボニル化合物のトラップ剤が加熱滅菌に安定ではない場合は、加熱を要しない滅菌法を用いることもできる。このような滅菌法には、例えば濾過滅菌などがある。また、予め加熱滅菌した腹膜透析液に、後で該トラップ剤を添加してもよい。添加する時期は特に制限されない。例えば、液を滅菌後に該トラップ剤を添加すれば、腹膜透析中のみならず、透析前の腹膜透析液保存中のカルボニル化合物の生成および／または蓄積を抑制することができるため好適である。

あるいは、腹膜透析直前または同時に該トラップ剤を添加することもできる。例えば、使用直前までベースとなる溶液とトラップ剤を前述の軟質プラスチックバッグなどに別々に収容し、腹膜透析開始直前に両者を無菌的に混合する。このためには、特開昭63-19149号に開示されているような剥離可能な接着部により仕切られた可撓性プラスチックバッグが好適に用いられる。

## 【0030】

あるいはまた、腹膜透析回路の途中に混注のためのコネクター部材を設け、該コネクターからトラップ剤を注入してもよい。

このような腹膜透析液の調製方法は、熱に不安定なトラップ剤のみならず、熱に安定なトラップ剤に対しても用いることができる。

さらにまた、腹膜透析液を小型の循環ポンプを使用して閉鎖系回路内で循環させるような腹膜透析法の場合にあっては、回路中のいずれかの箇所にカルボニル化合物トラップ剤を充填した濾過器を装置することもできる。

#### 【0031】

本発明の腹膜透析液は、現行の腹膜透析液と同様の腹膜透析処置に利用される。すなわち、透析患者の腹腔内に本発明による腹膜透析液を適量注入し、腹膜を通して生体内の低分子量成分を腹膜透析液内に移行させる。腹膜透析液は間欠的に循環させ、患者の症状に応じて透析を継続する。このときカルボニル化合物は、クレアチニンや無機塩類、あるいは塩素イオン等の透析成分とともに、血中や腹膜内から腹膜透析液中へ移行する。同時に、カルボニル化合物トラップ剤の作用により、その生体に対する障害活性がうばわれ、無害化される。

#### 【0032】

##### 【実施例】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって制限されるものではない。

##### 【実施例1】 腹膜透析液および腹膜透析排液中のカルボニル化合物量の測定

腹腔内におけるカルボニルストレスの発生を証明するため、以下の実験方法に従い、腹膜透析排液中のカルボニル化合物量を測定した。

##### 1) カルボニル化合物の測定

腹膜透析液（バクスター製、ダイアニールPD-2 2.5）および腹膜透析患者に前記の腹膜透析液を投与し腹腔内に一夜貯留後の腹膜透析排液をそれぞれ400 $\mu$ L採り、1.5mMの2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（2,4-DNPH）（和光純薬製）を0.5N塩酸溶液400 $\mu$ Lと混合後、30分間室温で攪拌し、液中のカルボニル化合物と2,4-DNPHを反応させた。次に1Mのアセトン水溶液40 $\mu$ Lを添加し、室温で5分間攪拌して過剰の2,4-DNPHをアセトンと反応させて除去した後、400 $\mu$ Lのn-ヘキサンで3回洗浄し、水層について360nmにおける吸光度をマイクロプレート用分光光度計（日本モレキュラーデバイス製 SPECTRAMax250）で測定した。

## 2) 検量線の作成

種々の濃度のグルコース水溶液を調製し、1)と同様に操作して、グルコースとグルコース由来のカルボニル量に対する検量線を作成した。

## 3) カルボニル化合物の定量

腹膜透析液および腹膜透析排液中のグルコース濃度をグルコース測定キット（和光純薬製、グルコース CII-テストワコー）を用いて測定した。検量線からグルコース由来のカルボニル量を求めた。液中の総カルボニル化合物の量からグルコース由来のカルボニル化合物の量を差し引き、カルボニル化合物の量とした。

得られた結果を図1に示す。腹腔内に一夜貯留された後の腹膜透析排液では、投与前の腹膜透析液と比較してカルボニル化合物量は約5倍となり、血中から腹腔内へのカルボニル化合物の移行が示された。

### 【0033】

[実施例2] 腹膜透析液患者の腹膜におけるカルボニル修飾蛋白の組織的局在  
腹膜透析患者の腹膜組織中のカルボニル化合物をマロンジアルデヒドを指標とした免疫染色法により調査した。

腹膜透析患者（50歳男性、腹膜透析歴5年）の腹膜組織について、Horieらの方法（Horie, K. et al., J. Clin. Invest., 100, 2995-3004(1997)）に従い、一次抗体としてマウス抗マロンジアルデヒドモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、剥離した中皮細胞下の結合組織および肥厚した血管壁に強い陽性所見を認めた（図2）。

マロンジアルデヒド（MDA）は過酸化脂質の分解により生成するカルボニル化合物である。そこで、MDA以外の過酸化脂質分解生成物である4-ヒドロキシ-2-ノネナール、および糖酸化反応の結果生成するカルボキシメチルリジンやペントシジンに対する抗体を用いて、同様に免疫染色を行った結果、図2で示された陽性部位と同様の箇所が陽性であった。このことから、腹膜透析患者の腹膜組織は、過酸化脂質分解生成物および糖酸化生成物由来のカルボニル化合物に起因するカルボニルストレスの亢進により、蛋白修飾を受けていることが分かった。

### 【0034】

[実施例3] 腹膜透析患者の透析液排液に対するカルボニル化合物トラップ剤

の添加効果

【0035】

<3-1>

ペントシジンはAGEの構造体の1つであり、腎不全患者の血中には健常人と比較して約20倍の蓄積が認められている (Miyata, T. et al., J. Am. Soc. Nephrol., 7: 1198-1206 (1996))。腹膜透析患者の排液を37℃でインキュベートした場合に増加するペントシジンおよびタンパク質上に存在するカルボニル基 (プロテインカルボニル) に対するアミノグアニジンの添加効果の検討を行った。

腹膜透析患者の一夜貯留排液を遠心後、上清を濾過滅菌 (孔径 0.45  $\mu$ m) し、アミノグアニジン (東京化成製) を0、1、10、100 mMの濃度になるように添加し、37℃でインキュベートした。インキュベート期間は、ペントシジンを測定する場合は1乃至2週間、プロテインカルボニルを測定する場合では2週間とした。ペントシジンの測定は、6N HCl中110℃でタンパク質を加水分解した後、HPLC (島津製作所製、LC-10A) で定量した (T.Miyataら, 1996, J. Am. Soc. Nephrol, 7:1198-1206, T.Miyataら, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:2353-2358)。プロテインカルボニルの測定は、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン (2,4-DNPH) (和光純薬製) と反応させた後、カルボニル基と反応して生成したヒドラゾンの吸光度を測定 (日本モレキュラーデバイス製、SPECTRAMax 250) することにより行った (Levine, R. L. et al., Methods Enzymol., 233, 346-357 (1994))。

その結果、ペントシジンの生成に対して、濃度依存的にアミノグアニジンの抑制効果が認められた (図4)。同様に、プロテインカルボニルの生成に対しても、濃度依存的にアミノグアニジンの抑制効果が認められた (図5)。

【0036】

<3-2>

次に、以下の実験方法に従い、腹膜透析患者の一夜貯留排液中のグルコース以外のカルボニル量に対するアミノグアニジンの添加効果を検討した。

#### ①腹膜透析排液のインキュベーション

腹膜透析施行患者の排液を採取し、孔径 0.45  $\mu$ mのフィルターで濾過した後、アミノグアニジン (東京化成製) を0、10、50および250mMの濃度となるように加

え、試料溶液とした。試料溶液 1mlを採り、スクリーキャップ付プラスチックチューブに分注した後、37℃で 15時間インキュベートした。なお、試料溶液は、インキュベーション直前まで、-30℃で保存した。

## ②カルボニル化合物の定量

### 1) 試料溶液の測定

試料溶液400  $\mu$ Lを採り、1.5mMの 2,4-DNPH (和光純薬製) を 0.5N塩酸溶液 40  $\mu$ Lと混合後、30分間室温で攪拌し、試料溶液中のカルボニル化合物と 2,4-DNPHを反応させた。次に、1Mのアセトン水溶液 40  $\mu$ Lを添加し、室温で5分間攪拌して過剰の 2,4-DNPH をアセトンと反応させて除去した後、試料溶液を 400  $\mu$ Lの n-ヘキサンで3回洗浄し、水層について 360nmにおける吸光度をマイクロプレート用分光光度計 (日本モレキュラーデバイス製 SPECTRAMax250) で測定した。

### 2) 検量線の作成

種々の濃度のグルコース水溶液を調製し、1) と同様に操作して、グルコースとグルコース由来のカルボニル量に対する検量線を作成した。

### 3) カルボニル化合物の定量

試料溶液中のグルコース濃度をグルコース測定キット (和光純薬製、グルコースCII-テストワコー) を用いて測定した。検量線からグルコース由来のカルボニル量を求めた。腹膜透析排液中の総カルボニル化合物の量からグルコース由来のカルボニル化合物の量を差し引き、カルボニル化合物の量とした。

その結果を図6に示す。腹膜透析患者の腹膜透析液排液中のグルコース以外のカルボニル量は、インキュベートしないものおよび37℃で15時間のインキュベートをしたもの共に、アミノグアニジンの濃度が増加するに従い減少した (図6)。

## 【0037】

これらの結果から、カルボニル化合物トラップ剤を腹膜透析液に添加、あるいは患者に投与することが、腹腔内に注入された腹膜透析液中のカルボニル化合物の生成および／または蓄積を抑制するために有効であることが明らかとなった。それにより、腹腔内に存在する腹膜透析液由来および血中由来のカルボニル化合物が除去され、腹膜透析患者のカルボニルストレス状態が改善される。

## 【0038】

【実施例4】 腹膜透析液の加熱滅菌過程におけるカルボニル化合物トラップ剤の添加効果

腹膜透析液中には、浸透圧剤として、高濃度(1.35~4.0 w/v%)のグルコースが含まれている。グルコースは熱に対して不安定で、加熱滅菌や保存中に分解する。グルコースの分解物として、5-ヒドロキシメチルフurfural(5-hydroxymethylfurfural;5-HMF)、レブリン酸、アセトアルデヒドなどが生成することが報告されている(Richard, J. U. et al., Fund. Appl. Toxic., 4: 843-853(1984)、Nilsson, C. B. et al., Perit. Dial. Int., 13: 208-213(1993))。腹膜透析液の加熱滅菌過程におけるアミノグアニジンのカルボニル化合物の生成抑制効果を5-HMF、カルボニル量を測定することにより検討した。なお、グルコースの分解の程度は液のpHの影響を受けることから、滅菌前のpHが酸性(pH5.3)および中性(pH7.0)の2種類の腹膜透析液を調製し、実験に供した。滅菌温度は121℃とした。

## 【0039】

## &lt;4-1&gt;

5-HMFの測定は、高速液体クロマトグラフィー(島津製作所製、LC-10A)を用いて、測定した(Nilsson, C. B. et al., Perit. Dial. Int., 13: 208-213(1993))。

その結果、酸性環境(図7)および中性環境(図8)共に、5-HMFの生成に対して、濃度依存的にアミノグアニジンの抑制効果が認められた。

## 【0040】

## &lt;4-2&gt;

腹膜透析液中のカルボニル化合物の定量は、実施例1と同様に2,4-DNPHと反応させた後、吸光度を測定することにより行った(Levine, R. L. et al., Methods Enzymol., 233: 346-357(1994))。滅菌温度は121℃とした。

その結果、カルボニル量に関しても、濃度依存的にアミノグアニジンの抑制効果が認められた(図9)。

## 【0041】



これらの結果から、腹膜透析液中にカルボニル化合物の生成を抑える薬剤を添加することが、腹膜透析液中のカルボニル化合物の生成および／または蓄積を抑制するために非常に有効であることが明らかとなった。

#### 【0042】

##### 【発明の効果】

本発明によれば、腹膜透析において患者を苦しめていたカルボニル化合物による障害を、簡単に取り除くことができる。公知の腹膜透析液においては、製造中に生じたカルボニル化合物とともに、透析処理によって生体内から透析液中に浸出したカルボニル化合物により、透析患者の腹膜は常にカルボニルストレスの状態に置かれていた。これに対して本発明では、透析液中に浸出したカルボニル化合物が効果的にトラップされるので、腹膜透析に伴うカルボニル化合物に起因する腹膜障害を含む腹膜透析に起因する障害の対策として非常に有効なアプローチということができる。

#### 【0043】

また、本発明では、加熱滅菌や長期保存時のグルコースの分解に由来するカルボニル化合物が除去されるため、従来グルコースの分解のために製剤学的に調製が困難であった中性域の pH を有する腹膜透析液を提供することができ、より生理的な腹膜透析療法が可能となる。

#### 【0044】

本発明の腹膜透析液は、トラップ剤を添加あるいは投与するのみで実施することができ、特殊な製造設備も要求しない。したがって、本発明による腹膜透析液、ならびにその製造方法は、腹膜透析治療における新しい治療概念を生み出すものである。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

腹膜透析液および腹膜透析排液中のカルボニル化合物量を示す図である。

##### 【図2】

腹膜透析患者の腹膜におけるカルボニル修飾蛋白の組織的局在を示す写真（上段）およびその模式図（下段）である。図中、Aは剥離した中皮細胞下の結合組

織中の陽性箇所を表す。Bは肥厚した血管壁の陽性箇所を表す。

【図 3】

腹膜透析患者の腹腔内でのカルボニルストレスを表す図である。

【図 4】

腹膜透析排液インキュベーションによるペントシジン生成に対するアミノグアニジンの添加効果を示す図である。

【図 5】

腹膜透析排液インキュベーションによるプロテインカルボニル生成に対するアミノグアニジンの添加効果を示す図である。

【図 6】

3 人の腹膜透析患者（患者 I、患者 S および患者 K）の腹膜透析 (CAPD) 排液中のカルボニル量に対する、アミノグアニジンの添加効果を示す図である。

【図 7】

酸性環境における腹膜透析液中の 5-HMF 生成に対する、アミノグアニジンの添加効果を示す図である。

【図 8】

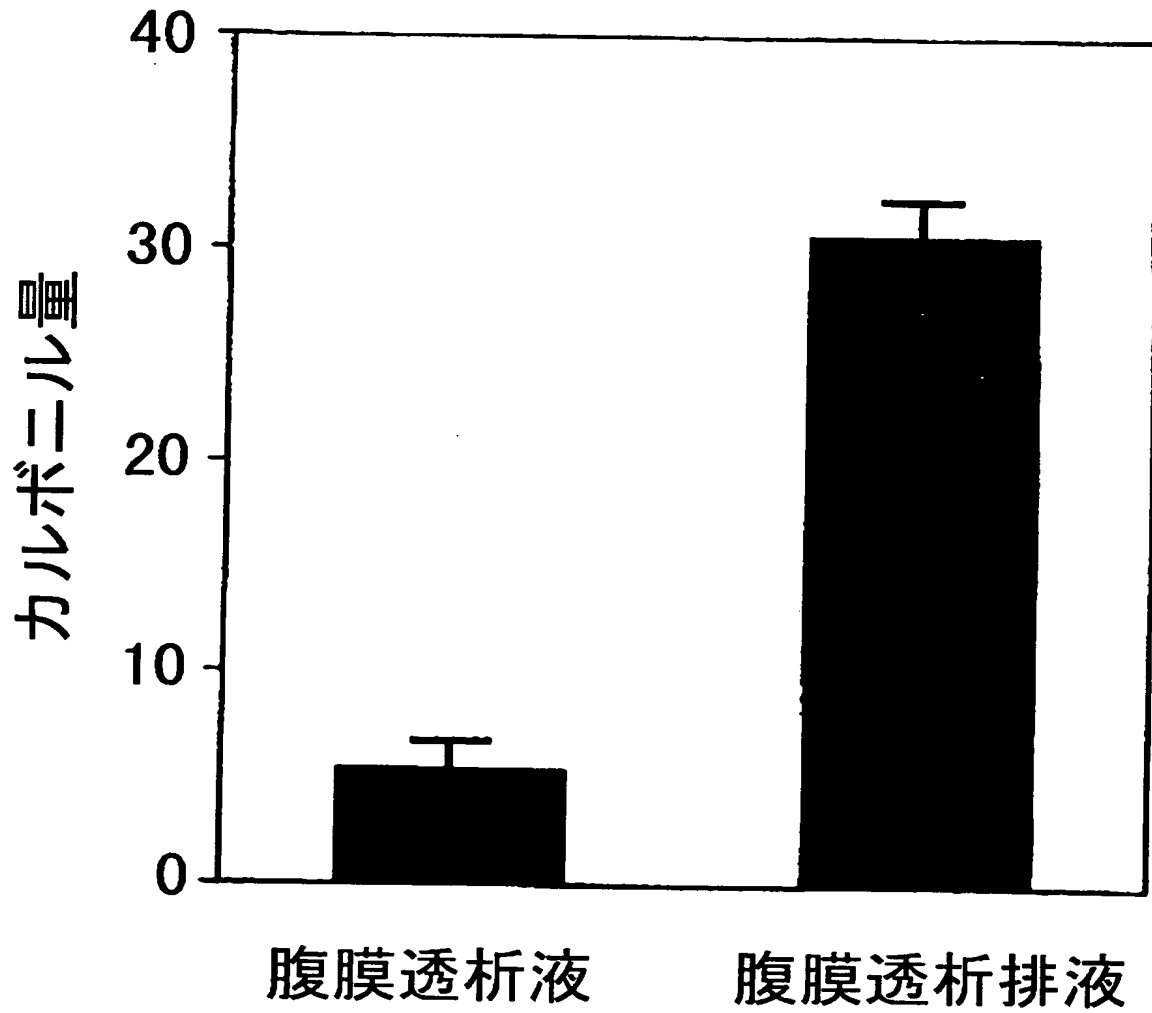
中性環境における腹膜透析液中の 5-HMF 生成に対する、アミノグアニジンの添加効果を示す図である。

【図 9】

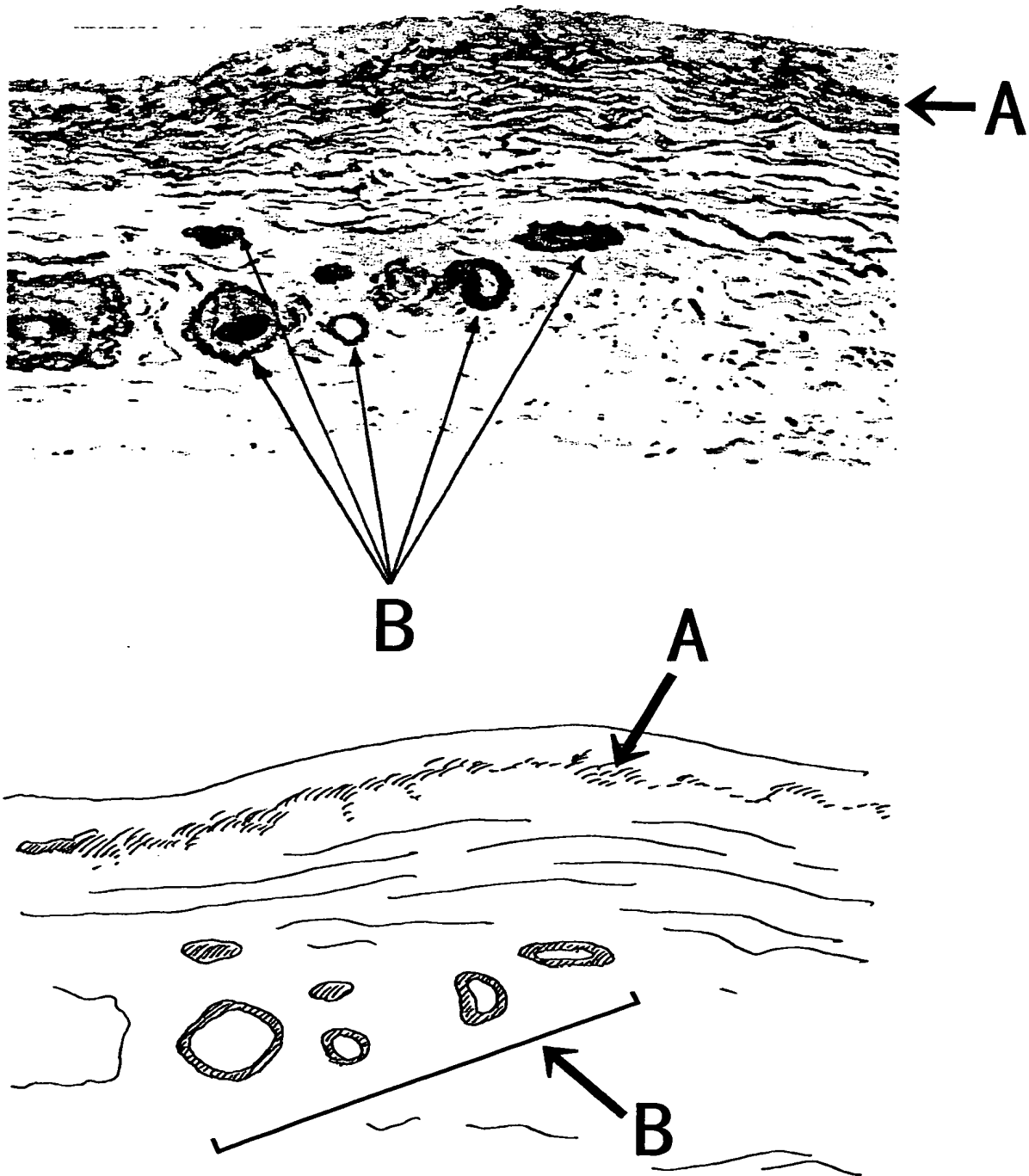
酸性および中性環境における腹膜透析液中のカルボニル量に対するアミノグアニジンの添加効果を示す図である。

【書類名】 図面

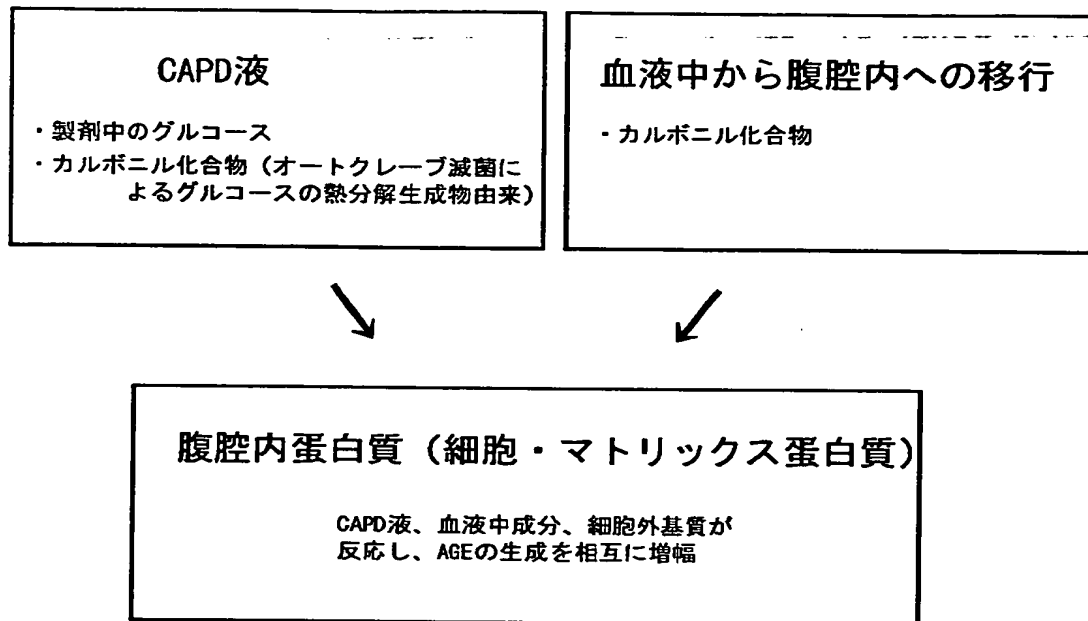
【図1】



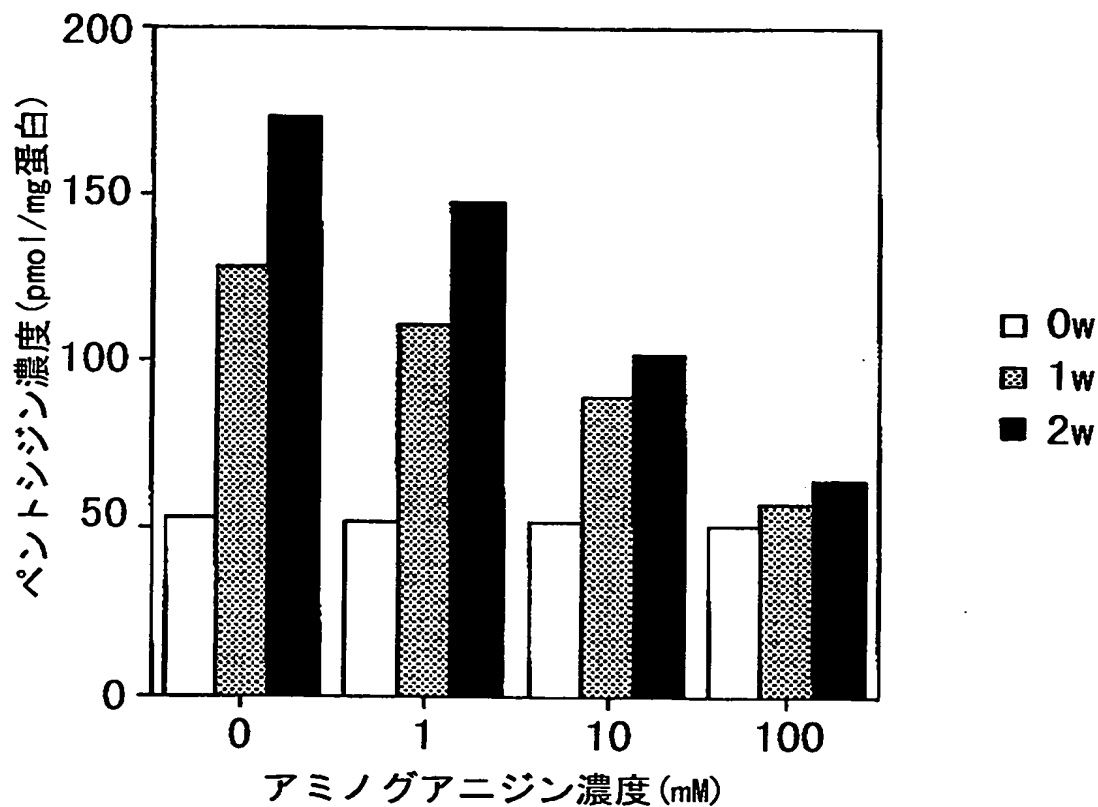
【図2】



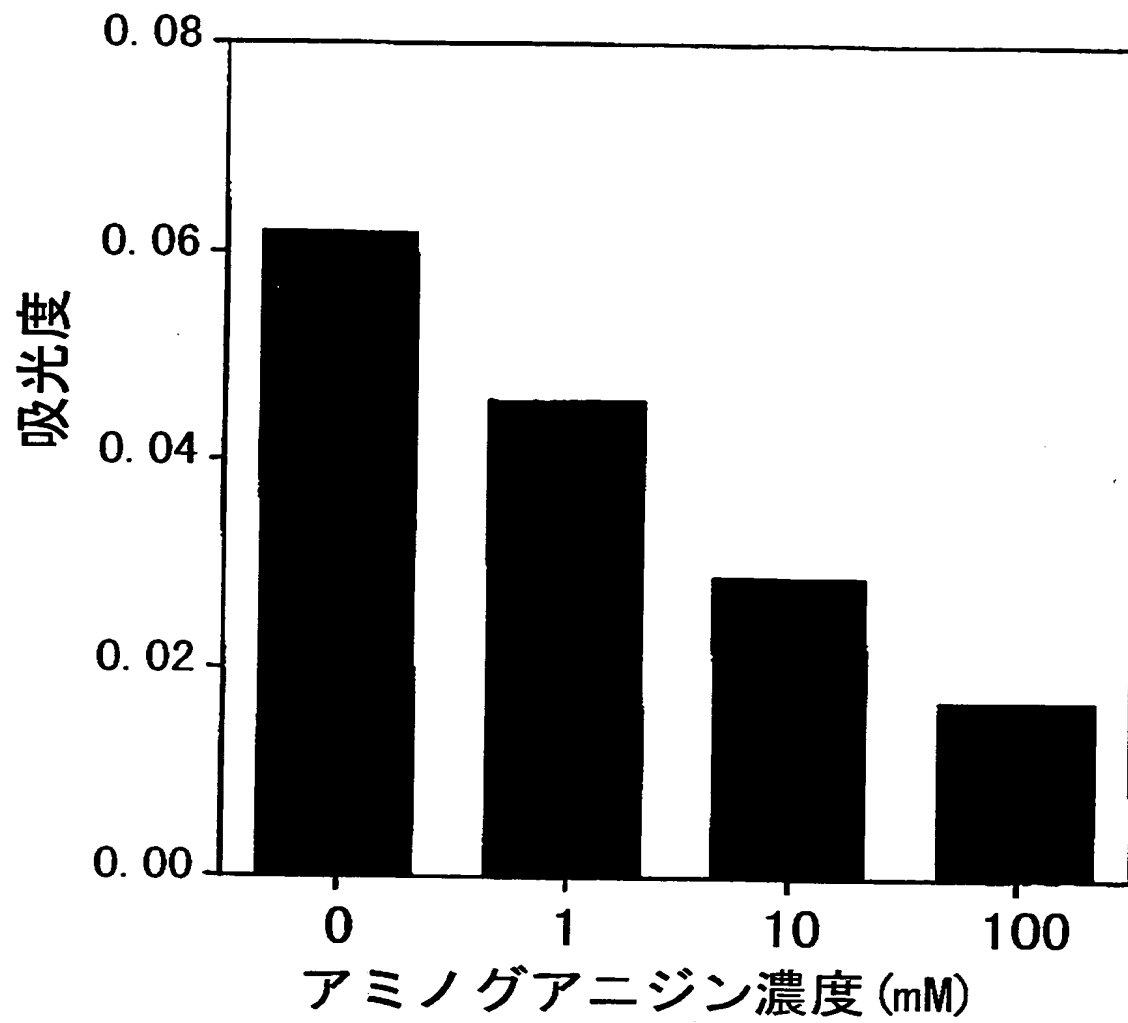
【図3】



【図 4】

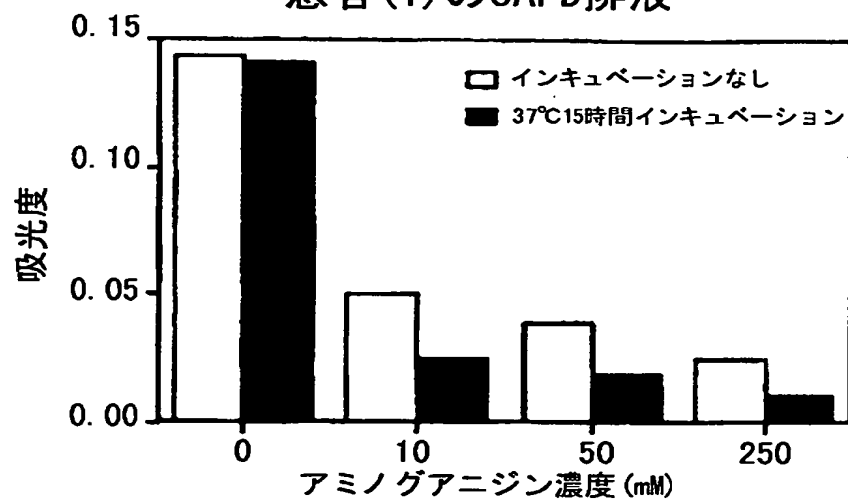


【図 5】

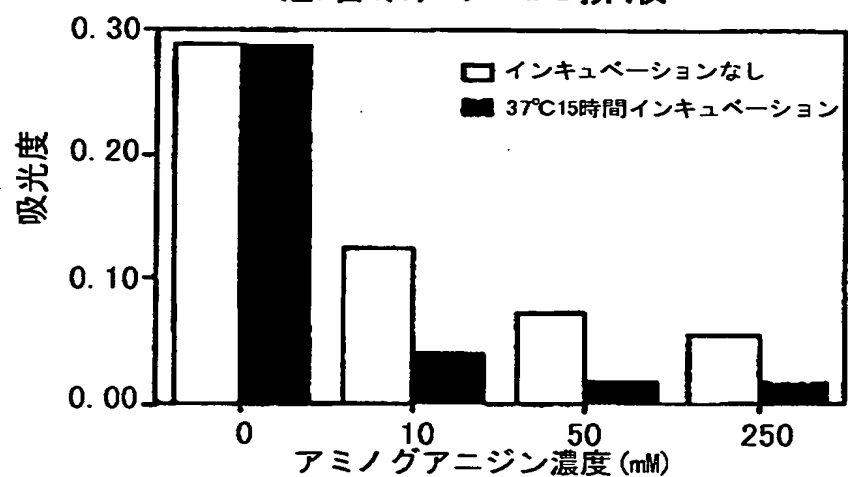


【図6】

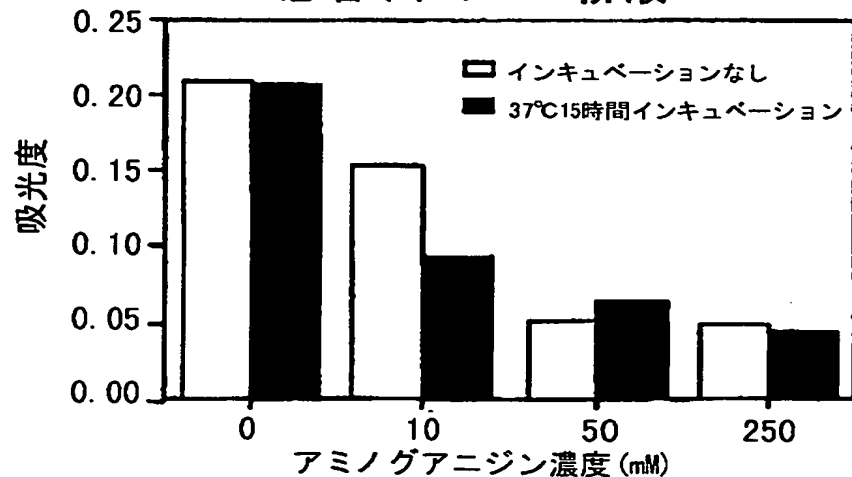
患者 (I) のCAPD排液



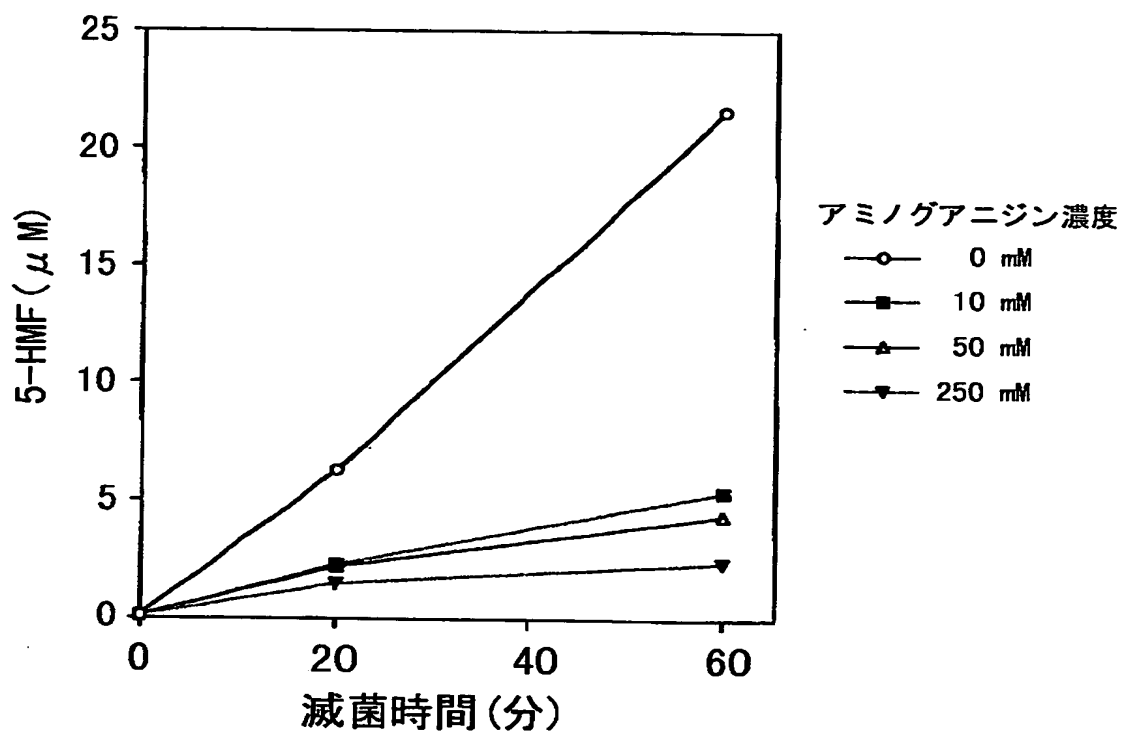
患者 (S) のCAPD排液



患者 (K) のCAPD排液

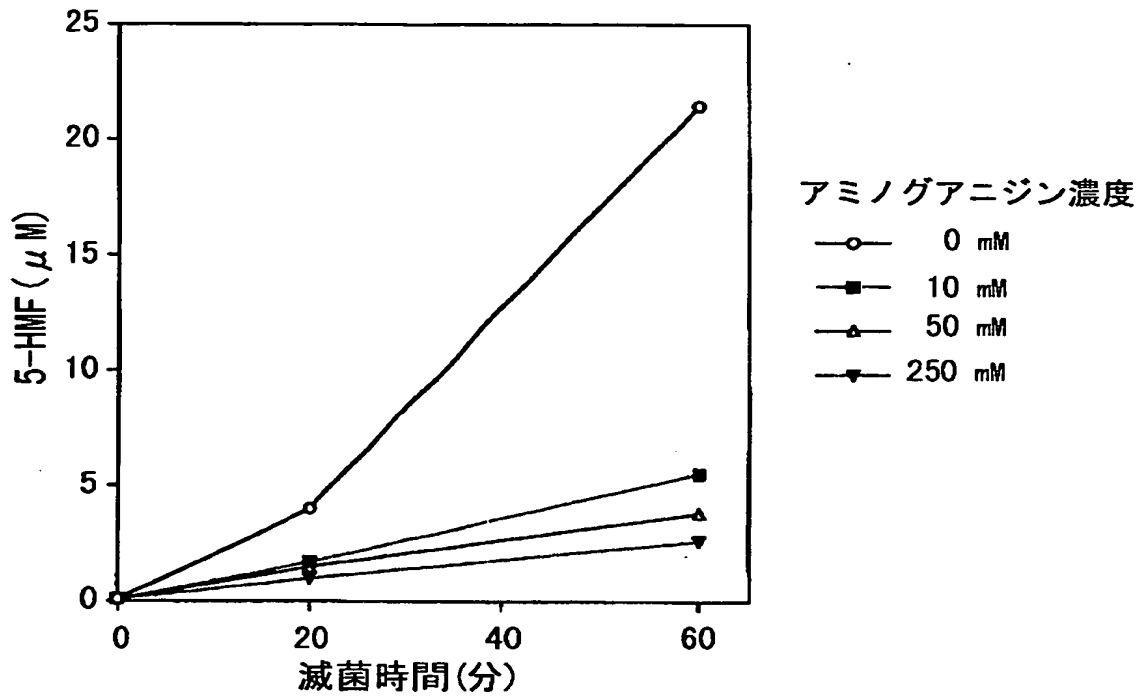


【図 7】

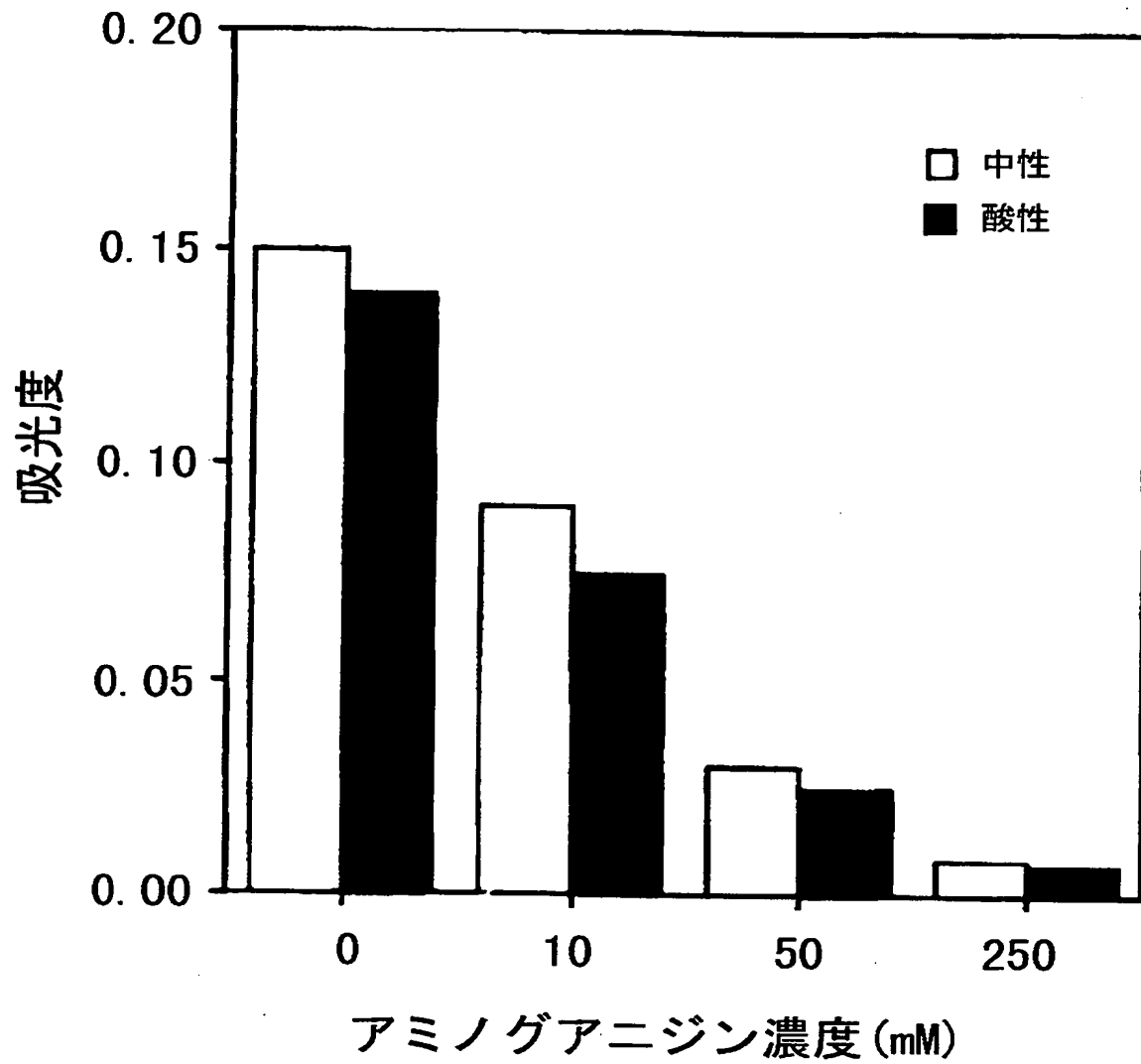


【図 8】





【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 腹膜透析において患者のQOLを低下させていたカルボニル化合物による障害を取り除くことが本発明の課題である。

【解決手段】 アミノグアニジンなどのカルボニル化合物トラップ剤を腹膜透析液に添加、あるいは患者に投与する。透析液の製造・保存中に生成するカルボニル化合物に加え、透析患者の血液や組織から透析液中に移行するカルボニル化合物をも無害化する。これによりカルボニル化合物による修飾産物の生成を抑制し、腹膜透析に伴う腹膜障害を軽減できる。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 597142387  
【住所又は居所】 東京都新宿区市谷柳町 4 9 市ヶ谷ヒルズ 4 0 1  
【氏名又は名称】 黒川 清

【特許出願人】

【識別番号】 597142376  
【住所又は居所】 神奈川県小田原市城山 3 - 3 - 1  
【氏名又は名称】 宮田 敏男

【代理人】

申請人  
【識別番号】 100102978  
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町 1 - 1 - 1 関鉄つくばビル 6 階  
清水国際特許事務所  
【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774  
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町 1 - 1 - 1 関鉄つくばビル 6 階  
清水国際特許事務所  
【氏名又は名称】 橋本 一憲

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [597142387]

1. 変更年月日	1997年 9月22日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都新宿区市谷柳町49市ヶ谷ヒルズ401
氏 名	黒川 清

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[597142376]

1. 変更年月日      1997年    9月22日  
  [変更理由]      新規登録  
      住 所      神奈川県小田原市城山3-3-1  
      氏 名      宮田 敏男
  
2. 変更年月日      1999年    2月10日  
  [変更理由]      住所変更  
      住 所      神奈川県伊勢原市東成瀬4-2-3-101  
      氏 名      宮田 敏男